

Contribution à l'étude de la combinaison du gossypol avec les autres constituants des amandes de graines de cotonniers au cours de certains traitements technologiques*

C. Tchiegang et J. Bourély

IRCT-CIRAD, BP 5035, 34032 Montpellier Cédex 1, France

Résumé

Les amandes, délipidées ou non, de graines de cotonniers avec ou sans glandes et la farine de soja sont traitées à froid ou à chaud en présence de gossypol, puis analysées. Des réactions se produisent entre le gossypol et les autres constituants des amandes. Quels que soient les farines et les traitements considérés, une combinaison importante du gossypol se traduit toujours par une diminution des teneurs en lysine disponible. Les teneurs en sucres solubles dans les farines varient peu, après la combinaison du gossypol à froid ou à chaud.

En revanche, l'hydrolyse ultérieure par l'acide acétique des liaisons formées entre la lysine, le gossypol et les autres constituants des farines, démasque les différentes fonctions ε-amines et les teneurs en lysine disponible augmentent en même temps que la couleur des farines devient plus claire et que celles-ci sont détachées. En outre, l'hydrolyse provoque le passage en solution de la presque totalité des sucres.

MOTS-CLES : *Gossypium*, farines, gossypol, réactions de combinaison, lysine disponible, sucres solubles.

Introduction

Du fait de leur richesse en huile et en protéines, les graines de cotonniers constituent une matière première très importante pour l'industrie agro-alimentaire des pays producteurs.

Au cours de la trituration industrielle des amandes (graines décortiquées), l'élévation de l'humidité et de la température provoque l'éclatement des glandes et la combinaison irréversible du gossypol qu'elles contiennent avec des résidus aminés libres, en particulier ceux de la lysine (LYMAN *et al.*, 1959), et avec d'autres constituants

des amandes (MARTINEZ *et al.*, 1961, 1967). Ces réactions entraînent une réduction de la toxicité du gossypol, mais aussi une diminution de la valeur nutritionnelle des tourteaux, due en particulier à l'altération des protéines (CARTER et LYMAN, 1970 ; CRAIG et BRODERICK, 1981).

Le but de ce travail est de contribuer à l'amélioration des connaissances des modalités de combinaison du gossypol avec les constituants des amandes, au cours de certains traitements technologiques.

Matériel et méthodes

Nature des échantillons

Cette étude a été effectuée sur des amandes broyées (non délipidées) de graines de cotonniers à glandes *Gossy-*

pium hirsutum (variété Pavlikéni), sur des amandes broyées et délipidées à l'hexane de cotonniers sans glande *Gossypium hirsutum* (variété BC4) et sur de la farine de soja. La farine de graines de cotonniers sans glande et la farine de soja nous ont servi de témoins.

* Cet article constitue la seconde partie de la thèse de Doctorat, soutenue le 31 janvier 1989 à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc (USTL) à Montpellier par Mr C. TCHIEGANG, sur l'« Etude des composés phénoliques des amandes des graines de cotonniers dans l'optique de la detoxification et de l'utilisation alimentaire des amandes et de leurs dérivés ».

Méthodes d'analyses

Dosage de la lysine disponible

La lysine disponible est déterminée par colorimétrie avec le 2,4,6 trinitrobenzène sulfonique (Sigma) selon la méthode décrite par KAKADE et LIENER, (1969).

Dosage du gossypol libre

Le gossypol libre est extrait par l'acétone aqueuse à 70 % (PONS et GUTHRIE, 1949), puis analysé par HPLC après évaporation de l'acétone (TCHIEGANG, 1989).

Dosage du gossypol total

Le gossypol total est la somme du gossypol libre et du gossypol combiné ou lié. Le gossypol combiné est hydrolysé par l'acide acétique, puis complexé par l'amino-3-propanol-1 (A3P1) (Merck) en présence du N,N diméthylformamide (DMF) (PONS *et al.*, 1958). L'extrait de gossypol total complexé par l'amino-3-propanol-1 est analysé par HPLC (TCHIEGANG, 1989).

Dosage des sucres solubles totaux

Les sucres solubles totaux sont extraits par l'éthanol à 80° G.L., puis dosés par chromatographie sur couche mince selon la méthode de BOURELY (1980).

Traitements subis par les matières premières

Combinaison à chaud du gossypol libre puis hydrolyse du gossypol lié

Amandes de cotonniers à glandes

Les amandes de graines de la variété à glandes Pavlikéni sont broyées finement au mortier, imbibées d'éthanol à 80° G.L., à raison d'un gramme de matière première pour un volume d'alcool, puis étuvées à 75° C., pendant deux heures. Les glandes à gossypol éclatent sous l'action de la solution hydroalcoolique et de la chaleur et libèrent ainsi, au contact de la matière, leur contenu dont le gossypol libre qui se combine avec certains constituants d'amandes. La matière est ensuite lavée à l'hexane distillé (1/12,5 ; p/vol). Cette opération élimine presque tout le gossypol libre résiduel et les lipides. Après séchage du résidu solide sous une hotte durant une nuit, on obtient une farine très jaune. Une partie de cette farine est traitée par l'acide acétique

selon la méthode de PONS *et al.*, (1958). Cette opération conduit à l'hydrolyse des liaisons formées entre le gossypol et certains constituants des farines, en particulier la lysine. Le gossypol libéré est aussitôt complexé par l'amino-3-propanol-1 (A3P1) dissous dans le N,N diméthylformamide (DMF), pour éviter toute recombinaison avec d'autres constituants. Après filtration, on obtient le gossypol dans la phase liquide et la farine, exempte de gossypol, qui est ensuite séchée à l'air libre. La figure 1 résume l'ensemble du protocole opératoire utilisé.

Farine de cotonniers sans gossypol et farine de soja

10 g de farine de graines sans gossypol ou de farine de soja, toutes deux délipidées à l'hexane, sont finement broyées au mortier, puis imbibées de 16 ml d'une solution de gossypol-acétique pur à 5,05 mg/ml dans l'éthanol à 80° G.L. (soit 0,85g de gossypol pour cent g de matière sèche). Ces préparations sont ensuite placées à l'étuve à 75° C. pendant deux heures. Le gossypol-acétique se fixe aux constituants des farines, dont la couleur devient brun foncé. Les farines sont ensuite lavées à l'hexane distillé (1/12,5 ; p/vol) pour éliminer la majeure partie du gossypol-acétique résiduel (fig. 1).

Comme précédemment, une partie des échantillons est ensuite soumise à l'hydrolyse par l'acide acétique (PONS *et al.*, 1958) et les produits obtenus analysés.

Combinaison à froid du gossypol libre, puis hydrolyse du gossypol lié

Amandes de cotonniers à glandes

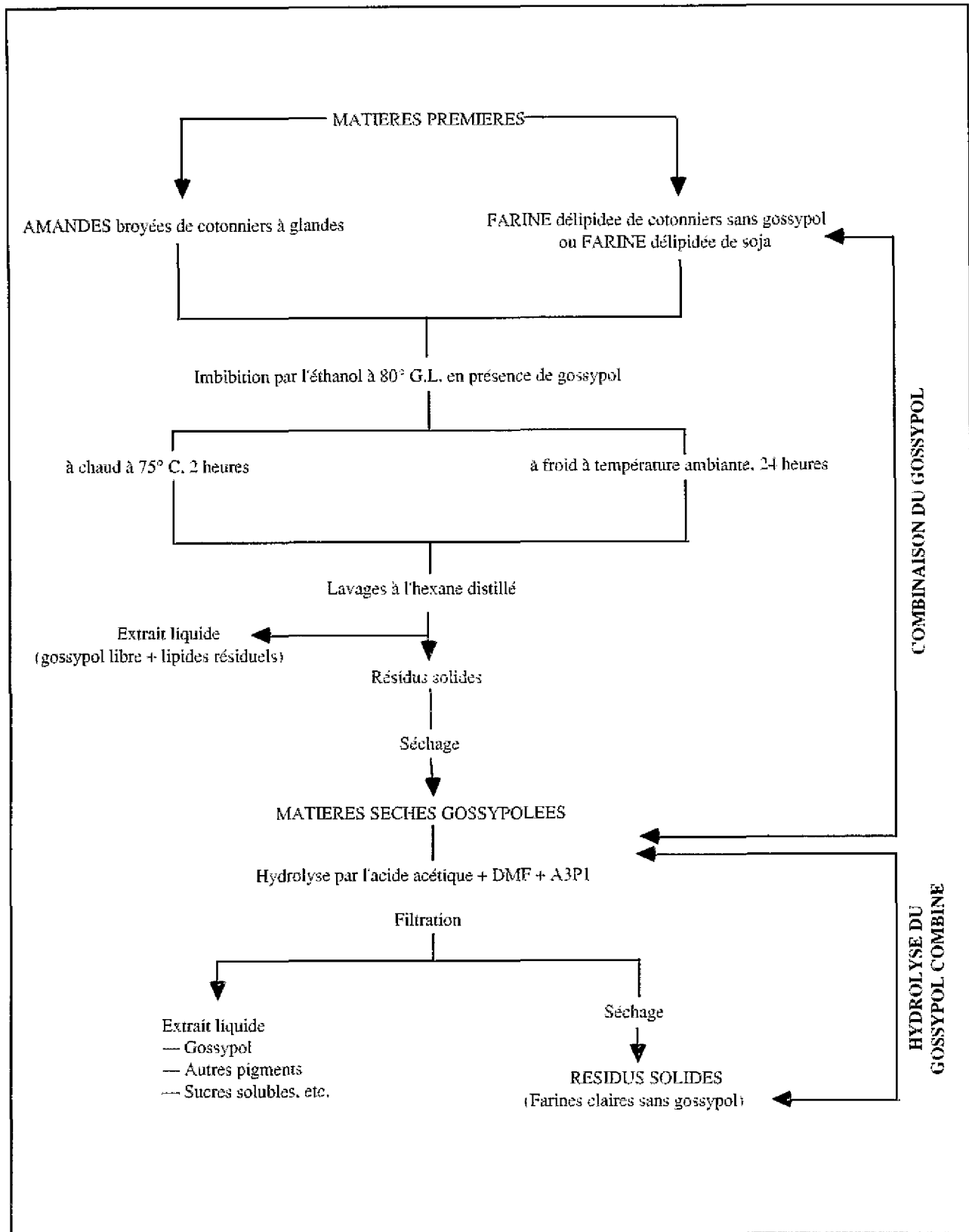
Les amandes finement broyées sont imbibées par l'éthanol à 80° G.L. (1/1 ; p/vol) laissées au repos pendant 24 heures, puis lavées à l'hexane distillé (1/12,5 ; p/vol) et séchées sous une hotte durant une nuit (fig. 1).

Le gossypol combiné de la matière ainsi obtenue est hydrolysé par l'acide acétique comme précédemment (PONS *et al.*, 1958). Les produits qui en dérivent sont ensuite analysés.

Farine de cotonniers sans gossypol et farine de soja

Les farines délipidées sont finement broyées, imbibées d'une solution de gossypol-acétique à 5,05 mg/ml dans l'éthanol à 80° G.L., puis laissées au repos pendant une nuit avant d'être lavées à l'hexane (fig. 1). Une partie des farines obtenues est traitée par une solution d'acide acétique et les produits qui en résultent sont analysés. L'autre partie est analysée telle quelle.

Figure 1
Protocole de combinaison du gossypol puis d'hydrolyse du gossypol combiné.
Procedure for the binding of gossypol and the hydrolysis of bound gossypol.



Résultats et discussion

Evolution des teneurs en gossypol, lysine disponible et sucres solubles totaux en fonction des traitements subis par les farines (avant hydrolyse du gossypol combiné)

Les différents résultats sont rassemblés dans le tableau 1.

Pour une matière première donnée, un traitement qui a pour effet une diminution de la teneur en lysine disponible se traduit aussi par une augmentation du taux de gossypol combiné.

La teneur en lysine disponible passe de 2,03 % dans la farine non traitée de cotonniers sans gossypol, à 1,73 % dans la farine traitée à chaud en présence de gossypol (qui contient, en fin de traitement, 0,34 % de gossypol combiné). La farine traitée à froid avec la même quantité de gossypol-acétique renferme 1,68 % de lysine disponible et 0,39 % de gossypol combiné. Si, à partir des données fournies dans le tableau 1, on calcule, pour la farine délipidée de graines sans gossypol, le rapport de la teneur en lysine disponible sur celle de la lysine disponible de la farine n'ayant subi aucun traitement, on constate que ce rapport passe de 85,22 % à chaud à 82,75 % à froid. Par contre, le rapport «gossypol combiné sur gossypol total»

passé respectivement de 87,18 % à 67,24 % pour les mêmes traitements. Par conséquent, toutes proportions gardées la variation, entre les deux traitements, des quantités de gossypol et de lysine qui se combinent à chaud et à froid, est plus importante pour le gossypol que pour la lysine.

Le taux de gossypol libre est toujours plus faible dans la farine traitée à chaud que dans celle avec laquelle il a subi un contact à froid. Cela tendrait à prouver que le gossypol se combine en plus grande quantité à chaud qu'à froid. C'est le cas pour les amandes broyées de cotonniers à glandes, mais c'est l'inverse pour la farine de cotonniers sans glande et la farine de soja.

On peut penser que le gossypol naturel contenu dans les glandes est plus réactif et a donc une plus grande affinité pour les constituants des amandes de graines de cotonniers à glandes que le gossypol-acétique pour les constituants des amandes de graines de cotonniers sans glande et la farine de soja. En outre, pour un traitement à froid, la durée d'imbibition et de contact du gossypol est plus longue, donc le gossypol aura le temps de se combiner en plus grande quantité avec les constituants de la farine.

TABLEAU 1

Evolution des teneurs en gossypol, en lysine disponible et en sucres solubles totaux des matières telles quelles ou après traitements à chaud ou à froid en présence de gossypol (% matières sèches).

Evolution of gossypol, available lysin and total soluble sugars of untreated substances in their original state after heat or cold treatment in the presence of gossypol (% DW).

Matières premières	Traitements	Gossypol		Libre	Combiné	% Combiné Total	Lysine disponible	Sucres solubles totaux
		Total Ajouté	Dosé					
Amandes broyées* de cotonniers à glandes (Plavlikéni) (non délipidées)	A chaud	0	1,22	0,08	1,13	92,62	1,20	9,67
	A froid	0	1,10	0,20	0,90	81,81	1,23	10,77
	0	0	0	0	0	0	2,03	11,07
Farine d'amandes de cotonniers sans gossypol (amandes délipidées)	A chaud, en présence de gossypol-acétique	0,85	0,39	0,05	0,34	87,18	1,73	9,90
	A froid, en présence de gossypol-acétique	0,85	0,58	0,19	0,39	67,24	1,68	9,17
	0	0	0	0	0	0	2,16	12,13
Farine de soja délipidée	A chaud, en présence de gossypol-acétique	0,85	0,33	0,07	0,26	78,78	1,93	12,09
	A froid, en présence de gossypol-acétique	0,85	0,44	0,09	0,35	79,54	1,90	11,93
	0	0	0	0	0	0	2,16	12,13

* La détermination de la lysine disponible n'a pas été possible dans les amandes broyées de cotonniers à glandes à cause des lipides.

* The presence of lipids made lysin determination impossible in crushed glanded cotton seed kernels.

D'autres hypothèses peuvent être émises pour expliquer que, dans la farine de cotonniers sans gossypol comme dans la farine de soja, le taux de gossypol combiné à froid est supérieur à celui qui se lie à chaud.

Du fait de l'accélération des réactions de combinaison par la chaleur, un grand nombre de sites sur lesquels aurait pu encore se fixer le gossypol se trouvent bloqués par des complexes mélanoides. Ces composés sont formés par le gossypol, les autres composés phénoliques, et d'autres constituants des amandes. Le gossypol en excès qui n'a pas pu se combiner est par conséquent éliminé en grande partie sous forme libre au cours du lavage à l'hexane. Ceci explique aussi que les taux de gossypol dosés soient toujours nettement inférieurs à la quantité de gossypol ajouté.

Le rapport gossypol combiné sur gossypol total augmente dans les farines de cotonniers, quand le taux de gossypol libre diminue. Dans la farine de soja délipidée ayant été traitée à froid avec du gossypol acétique, le rapport gossypol combiné sur gossypol total est légèrement supérieur à celui du traitement à chaud, alors que le taux de gossypol libre est plus élevé.

La farine non délipidée de cotonniers à glandes, traitée à froid (qui renferme encore 14,20% de matières grasses), contient pratiquement la même teneur en lysine disponible que la farine traitée à chaud (qui possède 9,90% de matières grasses) alors qu'elle contient plus de gossypol combiné. Ces résultats donnent à penser que le gossypol pourrait se fixer à d'autres constituants des amandes tels que les phospholipides (POMINSKI et PACK, 1957; MARTINEZ *et al.*, 1967; CARTER et LYMAN, 1969; MARKMAN et RZHEKHIN, 1969). En outre, le gossypol ne serait pas le seul composé phénolique impliqué dans le blocage de la lysine. Il y aurait, entre autres, les acides phénoliques et les flavonoïdes (DAMATY et HUDSON, 1975; REDDY et NARASINGA RAO, 1988). D'autres constituants des amandes tels que les produits d'oxydation des lipides (MARTINEZ *et al.*, 1961 et 1967; POKORNY *et al.*, 1987 et 1988) et les phytates (de RHAM et JOST, 1979; CHOI *et al.*, 1982) peuvent se fixer sur les terminaisons ϵ -amines des lysines des chaînes protéiques et diminuer ainsi les teneurs en lysine disponible.

Les teneurs en sucres solubles totaux varient légèrement d'un traitement à l'autre, mais rien ne prouve qu'ils forment des complexes avec le gossypol ou la lysine disponible dans les conditions de notre travail.

Evolution des teneurs en lysine disponible et en sucres solubles totaux après hydrolyse du gossypol combiné

Une partie des résidus solides obtenus après traitements des matières premières avec du gossypol libre ou du gossypol-acétique à chaud ou à froid a été traitée par l'acide acétique en vue de libérer la lysine ainsi que le gossypol, bloqués sous formes de complexes avec les

autres constituants des amandes ou des farines (fig. 1). Nous avons suivi l'évolution des teneurs en lysine disponible et en sucres solubles totaux avant et après hydrolyse des farines. L'ensemble de nos résultats est présenté dans les tableaux 2a, 2b et 2c.

Quelle que soit la matière première utilisée on note, comme nous l'avons souligné plus haut, une diminution des teneurs en lysine disponible après combinaison du gossypol à froid ou à chaud.

En revanche, après hydrolyse des farines par l'acide acétique, les teneurs en lysine disponible augmentent. Celle de la farine délipidée de cotonniers sans gossypol passe de 2,03 % (tableau 2a), pour la farine telle quelle, à respectivement 2,61 % (tableau 2b) et 2,67 % (tableau 2c) après traitements à froid ou à chaud et hydrolyse. Il se produit par conséquent un démasquage des différentes fonctions ϵ -amines des résidus de lysine préalablement bloqués dans la protéine originelle. En outre, l'hydrolyse qui provoque la libération de la lysine et du gossypol entraîne aussi celle d'autres constituants des farines (autres composés phénoliques, sucres solubles) qui se retrouvent en solution. Toutes les farines, brun foncé après combinaison du gossypol, deviennent plus claires (tendance jaune très claire) après hydrolyse du gossypol combiné.

Les teneurs en sucres solubles totaux des différentes matières ne varient pratiquement pas après traitements de combinaison avec le gossypol, à froid ou à chaud et varient peu en fonction des traitements. En revanche, après hydrolyse, les farines exemptes de gossypol renferment moins de 2,2 % de sucres solubles totaux alors qu'elles en contenaient plus de 11 % avant traitement. C'est ainsi que la farine de cotonniers sans gossypol délipidée qui contenait, telle quelle, 11,07 % de sucres solubles totaux (tableau 2a) n'en renferme plus que 1,87 % après traitement à froid puis hydrolyse (tableau 2b), et seulement 1,70 % après traitement à chaud puis hydrolyse (tableau 2c). Nous avons vérifié par chromatographie sur couche mince que la plus grande partie des oligosaccharides solubles se trouve en solution avec le gossypol après hydrolyse.

TABLEAU 2 a

Teneurs en lysine disponible et sucres solubles totaux de la farine de cotonniers sans gossypol et de la farine de soja délipidées (% MS).

Available lysin and total soluble sugar contents of lipid-free glandless cotton flour and soya flour (% DW).

Matières telles qu'elles	Lysine disponible	Sucres solubles totaux
Farine délipidée de coton sans gossypol	2,03	11,07
Farine délipidée de soja	2,16	12,13

TABLEAU 2 b

Evolution des teneurs en lysine disponible et en sucres solubles totaux, après combinaison du gossypol à froid, puis hydrolyse du gossypol ainsi lié (% MS).

Evolution of available lysin and total soluble sugars after cold binding with gossypol and then hydrolysis of the bound gossypol (% DW).

Constituants analysés	Lysine disponible		Sucres solubles totaux	
	Après combinaison avec le gossypol à froid	Après hydrolyse	Après combinaison avec le gossypol à froid	Après hydrolyse
Matières premières :				
Amandes à glandes broyées non délipidées	1,23	1,83	10,77	1,80
Farine délipidée de coton sans gossypol	1,68	2,61	9,17	1,87
Farine délipidée de soja	1,90	2,74	11,93	1,95

* Il a été impossible de déterminer la teneur en lysine disponible dans les amandes broyées, non traitées à froid ou à chaud, du fait d'un excès de lipides.

* *Excess lipids made it impossible to determine the available lysin contents in ground kernels not subjected to heat or cold treatment.*

TABLEAU 2 c

Evolution des teneurs en lysine disponible et en sucres solubles totaux, après combinaison du gossypol à chaud, puis hydrolyse du gossypol ainsi lié (% MS).

Evolution of available lysin and total soluble sugars after hot binding with gossypol and then hydrolysis of the bound gossypol (% DW).

Constituants analysés	Lysine disponible		Sucres solubles totaux	
	Après combinaison avec le gossypol à chaud	Après hydrolyse	Après combinaison avec le gossypol à chaud	Après hydrolyse
Matières premières :				
Amandes à glandes broyées non délipidées	1,20	1,84	9,67	2,00
Farine de coton sans gossypol délipidée	1,73	2,67	9,90	1,70
Farine de soja délipidée	1,93	2,80	12,09	2,20

Propositions d'interprétation des différentes interactions pouvant avoir lieu entre le gossypol et les résidus lysyls au cours des traitements

Le blocage des résidus de lysine explique la diminution de la valeur nutritive des farines (BALIGA et LYMAN, 1957 ; MARTINEZ *et al.*, 1961, 1967 ; CARTER et LYMAN, 1970 ; ARZU *et al.*, 1972 ; SMITH, 1970 ; CRAIG et BRODERICK, 1981).

La figure 2 montre quelques réactions du blocage des résidus lysyls par le gossypol pouvant avoir lieu au cours des traitements à froid ou à chaud des amandes et des farines.

Les groupements aldéhydes du gossypol peuvent fixer,

dans un premier temps, les fonctions ε-amines des résidus lysyls et donner des bases de Schiff. Dans le même temps, les groupements -OH en s'oxydant bloquent les ε-amines et il se forme alors des binaphthoquinonimines ou binaphthoquinonamines (fig. 2, voie I).

La deuxième possibilité est la formation d'un binaphthoquinonimine aldéhyde pouvant soit fixer les résidus de lysyls, soit se polymériser, réagir ensuite avec les fonctions ε-amines et engendrer des polymères bruns de hauts poids moléculaires (fig. 2, voie II).

La molécule du gossypol (fig. 2) peut donc offrir plusieurs types de liaisons :

- aldéhydes-amines en positions 8 et 8'
- quinones-amines en positions 1, 1', 6, 6', 7, 7'
- covalentes en positions 4 et 4'

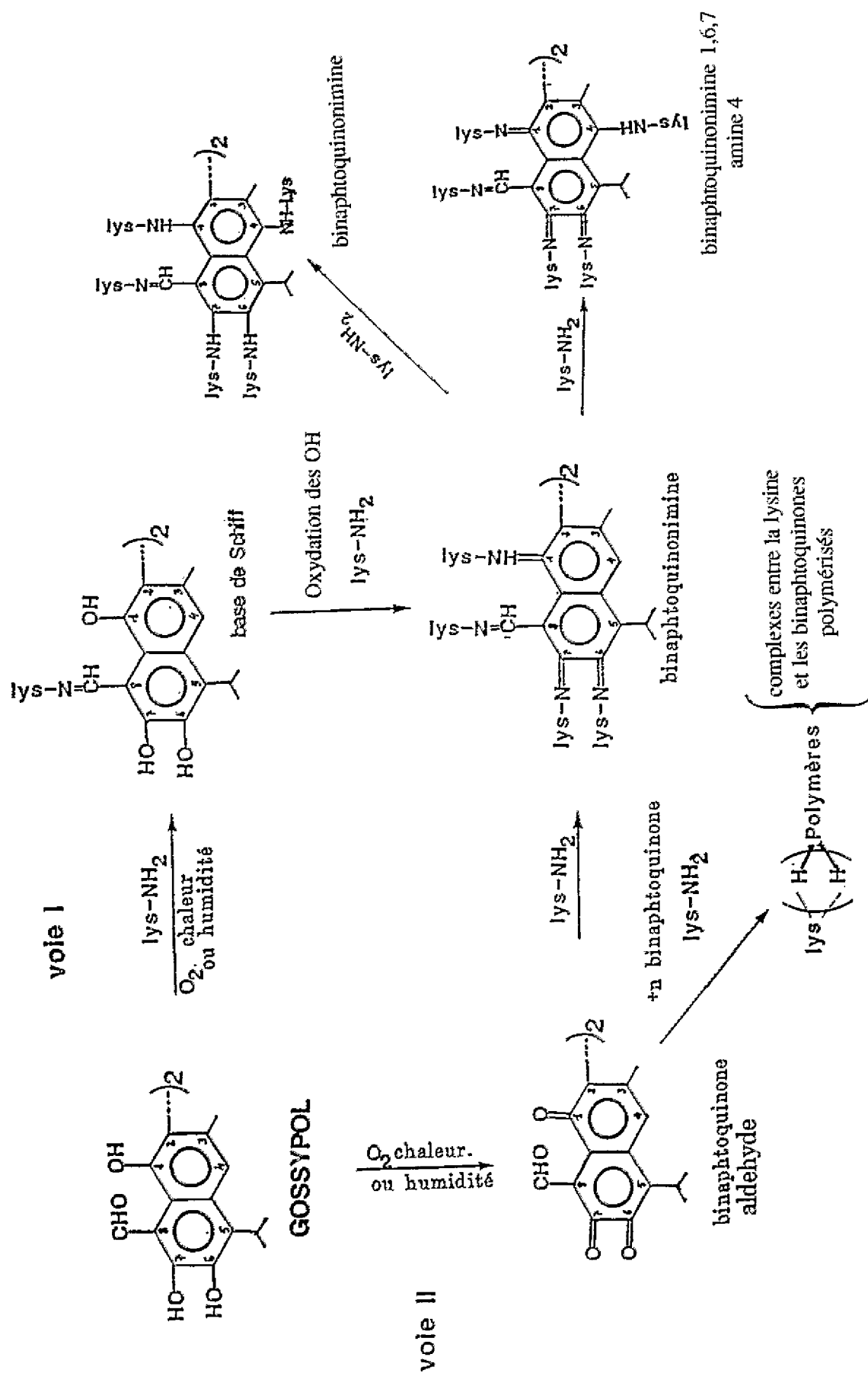


Figure 2
Quelques réactions possibles d'un résidu de lysyls avec le gossypol.
Several possible reactions of lysyl residue with gossypol.

Après le blocage de la lysine dans les bases de Schiff, l'étape principale, comme pour tous les autres composés phénoliques, serait la formation d'intermédiaires hydroxy-quinoniques et aminoquinoniques (SYNGE, 1978). Ces intermédiaires réagiraient entre eux, au niveau des positions non substituées de leurs cycles, pour donner des

polymères stables dont les unités seraient reliées entre elles, non seulement par des liaisons C-C, mais aussi par des ponts C-O-C et C-N-C (NICOLAUS, 1968). La présence de substituants azotés favorise la polymérisation avec d'autres acides aminés par rapport aux ouvertures des cycles (ANDREUX *et al.*, 1979).

Conclusion

Lorsque l'on traite des amandes de graines de cotonniers à froid ou à chaud, le gossypol se combine avec des constituants des amandes, en particulier la lysine. Ces réactions chimiques réduisent la disponibilité de la lysine et par là même la qualité des protéines, mais diminuent parallèlement la toxicité du gossypol par formation du gossypol combiné. En outre, des réactions de brunissement se produisent, même à froid.

Quels que soient la nature des farines et les traitements considérés, une combinaison importante du gossypol se traduit toujours par une diminution des teneurs en lysine disponible et un brunissement. L'hydrolyse ultérieure des

liaisons formées entre la lysine, le gossypol et les autres constituants des farines démasque les différentes fonctions ε-amines et les teneurs en lysine disponible augmentent.

Les teneurs en sucres solubles varient peu dans les farines, après la combinaison du gossypol et pratiquement pas en fonction des traitements subis, à froid ou à chaud. En revanche, l'hydrolyse ultérieure par l'acide acétique provoque le passage en solution de la presque totalité des sucres. En outre, elle libère les fonctions ε-amines de la lysine et le gossypol combiné et améliore en même temps la couleur des farines en les détoxifiant.

Références bibliographiques

- ANDREUX F., GOLEBIEWSKA D., METCHE M., 1979. - Polymérisation oxydative des o-diphénols en présence ou non d'acides-amino : cas des systèmes (catéchol-glycocolle) et (catéchol-diglycylglycine). *Colloque J.I.E.P.* 1979. *Bulletin de liaison groupe polyphénols*, vol. 9, 178-188.
- ARZU A., MAYORGA H., GONZALEZ J., ROLZ C., 1972. - Enzymatic hydrolysis of cottonseed protein. *J. Agric. Food Chem.* 20, 4, 805-809.
- BALIGA B.P., LYMAN C.M., 1957. - Preliminary report on the nutritional significance of bound gossypol in cottonseed meal. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 34, 21-24.
- BOURELY J., 1980. - Contribution à l'étude des sucres du cotonnier. *Cot. Fib. Trop.*, 35, 2, 189-208.
- CARTER C.M., LYMAN C.M., 1969. - Reaction of gossypol with amino acids and other amino compounds. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 46, 649-653.
- CARTER C.M., LYMAN C.M., 1970. - Effect of bound gossypol in cottonseed meal on enzymatic degradation. *Lipids*, 5, 9, 765-769.
- CHOI J.R., LUSAS E.W., RHEE K.C., 1982. - Fate of pigments and phytate during isolation of proteins from defatted glandless cottonseed flour. *J. Food sci.*, 47, 1032-1034.
- CRAIG W.M., BRODERICK G.A., 1981. - Effect of heat treatment on true digestibility in rat : in-vitro proteolysis and available lysine content of cottonseed meal protein. *J. Anim. Sci.* 52, 2 292-301.
- DAMATY S.M., HUDSON B.J.F., 1975. - Interaction of gossypol with cottonseed protein : potentiometric studies. *J. Sci. Food Agric.* 26, 1667-1672.
- DE RHAM O., JOST, T., 1979. - Phytate-protein interactions in soybean extracts and low phytate soy protein products. *J. Food Sci.* 44, 2, 596-600.
- KAKADE M.L., LIENER I.E., 1969. - Determination of available lysine in proteins. *Anal. Biochem.* 27, 273-280.
- LYMAN C.M., BALIGA B.P., SLAY, M.W., 1959. - Reaction of proteins with gossypol. *Arch. Biochem. Biophys.* 84, 486-497.
- MARKMAN A.L., RZHEKHIN V.P., 1969. - Gossypol and its derivatives. *Israël program for scientific translation*.
- MARTINEZ W.H., FRAMPTON V.L., CABELL C.A., 1961. - Effects of gossypol and raffinose on lysine content and nutritive quality of proteins in meals from glandless cottonseed. *J. Agric. Food Chem.* 9, 64-66.

- MARTINEZ W.H., BERARDI L.C., FRAMPTON V.L., WILCKE H.L., GREENE D.E., TEICHMAN R., 1967. - Importance of cellular constituents to cottonseed meal quality. *J. Agric. Food Chem.* 15, 3, 427-432.
- NICOLAUS R.A., 1968. Melanins. - *Edition Hermann*, Paris, France.
- POKORNY J., JANITZ W., VIDEN L., VELISEK J., VALENTOVA H., DAVIDEK J., 1987. - Reaction of oxidized lipids with protein. Part 14. Aldolization reaction of lower alkanals in the presence of non lipidic substances. *Die Nahrung* 31, 63-70.
- POKORNY J., DAVIDEK J., TRAN HA CHI, VALENTOVA, H., MATEJICEK, J., DLASKOVA, Z., 1988. - Reaction of oxidized lipids with proteins. Part 15. Mechanism of lipoprotein formation from interactions of oxidized ethyllinoleate with egg albumin. *Die Nahrung* 4, 343-350.
- POMINSKI J., PACK F.C., 1957. - The destruction of gossypol in cottonseed oil soapstock by a heat treatment. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 34, 299-301.
- PONS W.A., GUTHRIE J.D., 1949. - Determination of free gossypol in cottonseed materials. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 26, 671-676.
- PONS W.A., PITTMAN R.A., HOFFPAUER C.L., 1958. - 3 amino-1-propanol as a complexing agent in the determination of total gossypol. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 35, 93-97.
- REDDY M., NARASINGA RAO M.S., 1988. - Interaction of gossypol with gossypin (11 s protein) and congossypium (7 s protein) of cottonseed and glycinin (11 s protein) of soybean. 1. Reaction kinetics, binding stoichiometry, and reversibility studies. *J. Agric. Food. Chem.* 36, 2, 246-252.
- SMITH K.J., 1970. - Practical significance of gossypol in feed formulation. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 47, 448-450.
- SYNGE R.L.M., 1973. - Polyphenol-protein reaction and their significance for agricultural practices. *Colloque J.I.E.P. Bulletin de liaison groupe polyphénols* 8, 13-24.
- TCHIEGANG C., 1989. - Etude des composés phénoliques des amandes des graines de cotonniers dans l'optique de la détoxification et de l'utilisation alimentaire des amandes et de leurs dérivés. *Thèse de Doctorat, U.S.T.L, Montpellier, France.*

Contribution to the study of the combination of gossypol and other constituents of cotton seed kernels during certain technological treatments*

C. Tchiegang and J. Bourély

Summary

Glanded and glandless cotton seed kernels, with and without lipids removed, and soya flour were treated under hot and cold conditions in the presence of gossypol and then analysed. Reactions took place between the gossypol and the other constituents of the kernels. Considerable combination of gossypol always resulted in a fall in available lysin contents with all flours and treatments. The soluble sugar contents of the flours varied little

after hot or cold combination with gossypol. However, subsequent acetic acid hydrolysis of the combinations of lysin, gossypol and the other flour constituents revealed the different ϵ -amines functions; the available lysin contents increased while flours became paler and detoxified. Hydrolysis also resulted in the dissolving of almost all the sugars.

KEY WORDS: *Gossypium*, flours, gossypol, combination reactions, available lysin, soluble sugars.

Introduction

Cotton seeds are rich in oil and proteins and constitute important raw material for the agro-food industry in producing countries. During the industrial pressing of the kernels (decorticated seeds), the rise in moisture content and temperature causes the bursting of the glands and the irreversible binding of the gossypol that they contain with free amine residues and in particular lysin residues (LYMAN *et al.*, 1959) and other kernel constituents (MARTINEZ *et al.*, 1961, 1967). These reactions result in

a fall in gossypol toxicity and also decreased nutritional value of the cake, caused in particular by protein degradation (CARTER and LYMAN, 1970; CRAIG and BRODERICK, 1981).

The aim of the work described here is to improve knowledge of the way in which gossypol combines with kernel constituents during certain technological treatments.

Material and methods

Samples

The work was carried out on ground kernels (lipids not removed) of glanded *Gossypium hirsutum* (Pavlikeni variety), on ground (lipids removed by hexane) kernels of glandless *Gossypium hirsutum* (BC4 variety) and on soya flour. The glandless cotton flour and the soya flour were used as controls.

Methods of analysis

Determination of available lysin

Available lysin was determined by colorimetry with 2,4,6 sulphonic trinitrobenzene (Sigma) using the method described by KAKADE and LIENER (1969).

Determination of free gossypol

Free gossypol was extracted by aqueous acetone 70% (PONS and GUTHRIE, 1949) and analysed by HPLC after evaporation of the acetone (TCHIEGANG, 1989).

Determination of total gossypol

Total gossypol is the sum of the free and the combined or bonded gossypol. Bonded gossypol was hydrolysed by acetic acid and then complexed with amino-3-propanol-1 (A3P1) (Merck) in the presence of N,N dimethylformamide (DMF) (PONS *et al.*, 1958). The total gossypol extract complexed by A3P1 was analysed by HPLC (TCHIEGANG, 1989).

* This paper constitutes the second part of a doctoral thesis defended on 31 January 1989 at Université des Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, by C. Tchiegang on "Study of the phenolic compounds in cotton seed kernels for the detoxification and use as a foodstuff of kernels and their derivatives".

Determination of total soluble sugars

Total soluble sugars were extracted by ethanol at 80° GL and determined by TLC using BOURELY's method (1980).

Treatments of raw materials

Hot binding of free gossypol followed by hydrolysis of bound gossypol.

Glanded cotton seed kernels

Cotton seed kernels of the glanded Pavlikeni variety were ground finely in a mortar, soaked in ethanol 80° GL at 1 gramme raw material per volume of alcohol and then heated to 75°C for two hours. The water-alcohol solution and the heat caused the gossypol glands to burst; these released their free gossypol content which combined with certain kernel constituents. The material was then washed with distilled hexane (1/12.5 w/v). This removed practically all the residual free gossypol and the lipids. The solid residue was dried under a hood overnight, giving a very yellow flour. Part of this flour was treated with acetic acid using the method described by PONS *et al.* (1958). This resulted in the hydrolysis of the bonds which had formed between the gossypol and certain flour constituents - lysin in particular. The gossypol released was immediately complexed by amino-3-propanol-1 (A3P1) dissolved in N,N dimethylformamide (DMF) to prevent any re-bonding with other constituents. Filtration gave gossypol in the liquid phase and gossypol-free flour which was air-dried. The procedure used is shown in Figure 1.

Glandless cotton flour and soya flour

10 g of glandless cotton and soya flours defatted by

hexane which were then finely ground in a mortar and then soaked in 16 ml of a 5.05 mg/ml gossypol acetic acid solution in ethanol at 80° GL (i.e. 0.85 g of gossypol per 100 g dry weight). These preparations were placed in an oven at 75°C for two hours. The gossypol-acetic acid solution combined with flour constituents and the flour turned dark brown. Flours were then washed with distilled hexane (1/12.5 w/v) to remove most of the residual gossypol-acetic acid solution (Figure 1).

As above, a part of the samples were then subjected to acetic acid hydrolysis (PONS *et al.*, 1958) and the resulting products were analysed.

Cold binding of free gossypol and hydrolysis of bound gossypol

Glanded cotton seed kernels

Finely ground kernels were soaked in ethanol 80° GL (1/1 w/v), left to stand for 24 hours, washed with distilled hexane (1/12.5 w/v) and dried under a hood overnight (Figure 1). The combined gossypol in the material obtained was hydrolysed with acetic acid as above (PONS *et al.*, 1958). The resulting substances were analysed.

Glandless cotton flour and soya flour

Lipid-free flours were finely ground, soaked in a gossypol-acetic acid solution at 5.05 mg/ml in ethanol 80° GL and then left to stand overnight before being washed in hexane (Figure 1). Part of the flour obtained was treated with an acetic acid solution and the products were analysed. The other part was analysed without treatment.

Results and discussion

Evolution of gossypol contents, available lysin and total soluble sugars according to flour treatments (before the hydrolysis of combined gossypol)

The results are shown in Table 1.

A treatment which resulted in a fall in the available lysin content in a given raw material also resulted in an increase in combined gossypol. The available lysin content increased from 2.03% in untreated glandless cotton flour to 1.73% in flour heat-treated in the presence of gossypol (and which contained 0.34% combined gossypol at the end of the treatment). Flour treated cold with the same quantity of gossypol-acetic acid contained 1.68% available lysin and 0.39% combined gossypol. The data in Table 1 can be used to show that the ratio of available lysin in lipid-removed glandless cotton flour to that of the untreated flour fell from 85.22% (hot) to 82.75% (cold) whereas the "combi-

ned gossypol/total gossypol" ratio fell from 87.18% to 67.24% with the same treatments. Consequently, the variation between the two treatments in the amounts of gossypol and lysin combined under hot and cold conditions was proportionally greater for gossypol than for lysin.

The amount of free gossypol was always lower in hot-treated than in cold-treated flour. This would appear to show that more gossypol combines when hot than cold. This was the case for ground glanded cotton, but the opposite applied in the case of glandless cotton flour and soya flour.

It can be considered that the gossypol naturally found in the glands is more reactive and thus has a greater affinity for the constituents of glanded cotton seeds than that of the gossypol-acetic acid solution for the constituents of gland-

less cotton seeds and soya flour constituents. In addition, in cold treatment the duration of soaking and contact with gossypol was longer and the latter would thus have the time to combine in larger quantities with flour constituents.

Other hypotheses can be put forward to explain why more gossypol combines cold than hot in glandless gossypol flour and soya flour. The acceleration of combination reactions by heat blocks a large number of potential gossypol fixing sites with melanoid complexes. These compounds are formed by gossypol, the other phenolic compounds and other kernel constituents. Much of the uncombined excess gossypol is then removed in free form during washing with hexane. This also explains why the amounts of gossypol observed are always distinctly smaller than the amount of gossypol added.

The "combined gossypol/total gossypol" ratio increased in cotton flours when the gossypol content fell. In lipid-removed soya flour treated cold with gossypol-acetic acid, the combined gossypol/total gossypol ratio was slightly higher than that observed in heat treatment, whereas the free gossypol level was higher.

Cold treated glanded cotton flour (lipids not removed and still containing 14.20% fats) had almost the same available lysin content as heat-treated flour (which contained 9.90% fats) even though it contained more combined gossypol. These results lead to considering that gossypol may become fixed to other kernel constituents such as phospholipids (POMINSKI and PACK, 1957; MARTINEZ *et al.*, 1967; CARTER and LYMAN, 1969; MARKMAN and RZHEKHIN, 1969). In addition, gossypol may not be the only phenolic compound involved in lysin blockage. Others may include phenolic acids and flavonoids (DAMATY and HUDSON, 1975; REDDY and NARASINGA RAO, 1988). Other kernel constituents such as lipid oxidation products (MARTINEZ *et al.*, 1961 and 1967; POKORNY *et al.*, 1987 and 1988) and phytates (DE RHAM and JOST, 1979; CHOI *et al.*, 1982) can become fixed to the ϵ -amine terminals of lysins in protein chains and thus reduce the amounts of available lysin.

Total soluble sugar contents varied slightly in the different treatments, but there is nothing to prove that these sugars formed complexes with gossypol or available lysin under the experimental conditions described here.

Evolution of the amounts of available lysin and total soluble sugars after the hydrolysis of combined gossypol

Part of the solid residue obtained after the hot or cold treatment of the raw materials with free gossypol or gossypol-acetic acid solution was treated with acetic acid to release the lysin and gossypol blocked in complex form with the other kernel or flour constituents (Figure 1). The evolution of the available lysin and total soluble sugar contents were monitored before and after flour hydrolysis.

All the results are shown in Tables 2a, 2b and 2c.

As mentioned above a decrease in the available lysin contents after hot or cold combination of gossypol was observed whatever the raw material used. In contrast, available lysin contents increased after the acetic acid hydrolysis of the flours. That of defatted glandless cotton flour increased from 2.03% (Table 2a) for the untreated flour to 2.61% (Table 2b) and 2.67% (Table 2c) respectively after hot or cold treatment and hydrolysis. The various ϵ -amine functions of the lysin residues previously blocked in the original protein were therefore uncovered. In addition, the hydrolysis which caused the release of lysine and gossypol also released other flour constituents (other phenolic compounds and soluble sugars) which went into solution.

All the flours were dark brown after binding with gossypol and became paler (tending towards very pale yellow) after the hydrolysis of combined gossypol.

The total soluble sugar contents of the various substances hardly varied at all after hot or cold combination treatments with gossypol and was similar in all treatments. In contrast, after hydrolysis, glandless flours contained less than 2.2% total soluble sugars whereas the figure was 11% before the treatments. Thus defatted glandless cotton flour in its original state contained 11.07% total soluble sugars (Table 2a) contained only 1.87% after cold treatment followed by hydrolysis (Table 2b) only 1.70% after heat treatment followed by hydrolysis (Table 2c). Thin layer chromatography was used to verify that most of the soluble oligosaccharides were in solution with gossypol after hydrolysis.

Proposed interpretations of the various interactions which may take place between gossypol and lysyl residues during the treatments

The blocking of lysine residues accounts for the decrease in the nutritive value of flours (BALIGA and LYMAN, 1957; MARTINEZ *et al.*, 1961, 1967; CARTER and LYMAN, 1970; ARZU *et al.*, 1972; SMITH, 1970; CRAIG and BRODERICK, 1981).

Figure 2 shows several lysyl residue blockage reactions caused by gossypol which can take place during cold or heat treatments of kernels and flours. First, gossypol aldehyde groups can fix the ϵ -amine functions of the lysyl residues and give Schiff bases. At the same time, the -OH groups oxidise and block the ϵ -amines; binaphthoquinonimines or binaphthoquinonamines are subsequently formed (Figure 2, pathway I).

The second possibility is the formation of a binaphthoquinone aldehyde which can first fix the lysyl residues and polymerise and then react with the ϵ -amine functions and produce brown polymers with high molecular weights (Figure 2, pathway II). The binaphthoquinone aldehyde formed by pathway II can evolve in the presence of lysyl residues into binaphthoquinonimine 1,6,7 amine 4 (Figure

2, pathway II) with binaphthoquinonimine as the intermediary.

Several types of bond are thus possible with gossypol (Figure 2):

- aldehydes-amines in positions 8 and 8'
- quinones-amines in positions 1, 1', 6, 6', 7 and 7'
- covalent bonds in positions 4 and 4'.

After the blocking of lysin in Schiff bases, the main stage - as for all other phenolic compounds - may be the formation of hydroxyquinonic and aminoquinonic intermediaries (SYNGE, 1978). These intermediaries interact at the non-substituted positions of their cycles and give stable polymers which are probably connected not only by C-C bonds but also by C-O-C and C-N-C bridges (NICO-LAUS, 1968). The presence of nitrogenous substituents enhances polymerisation with other amino acids in relation to the beginning of cycles (ANDREUX *et al.*, 1979).

Conclusion

When cotton seed kernels are subjected to heat or cold treatment, gossypol combines with the kernel constituents and in particular with lysin. These chemical reactions reduce lysin availability and hence protein quality, but also reduce gossypol toxicity by the formation of combined gossypol. Browning reactions also take place even under cold conditions.

Whatever the nature of the flours and the treatments in question, considerable combination of gossypol always results in a fall in the amount of free lysin and in browning. The subsequent hydrolysis of the bonds between lysin,

gossypol and the other flour constituents uncovers the various α -amine functions and the available lysine content increases.

The soluble sugar contents vary little in the flours after the binding of gossypol and hardly at all in the cold or heat treatments applied. However, subsequent acetic acid hydrolysis results in the putting in solution of practically all the sugars. It also releases the α -amine functions in lysin and combined gossypol and simultaneously improves the colour and detoxifies the flours.

Contribución en el estudio de la combinación del gossipol con otros componentes de las almendras de las semillas del algodónero durante ciertos tratamientos tecnológicos

C. Tchiegang y J. Bourély

Resumen

Las almendras, a las que se ha quitado o no los lípidos, de la semilla del algodónero con o sin glándulas y la harina de soya se tratan con frío o con calor en presencia de gossipol; luego se analizan. Unas reacciones se producen entre el gossipol y los demás componentes de las almendras. Cualesquiera que sean las harinas y los tratamientos, una combinación importante del gossipol siempre provoca una disminución del contenido de lisina disponible. El contenido de azúcar soluble en las harinas varía poco, después de la combinación de gossipol con frío o con calor.

En cambio, la hidrólisis ulterior mediante el ácido acético de las combinaciones que se forman entre la lisina, el gossipol y los demás componentes de las harinas revela las diferentes funciones α -aminas y el contenido de lisina disponible aumenta al tiempo que el color de las harinas se vuelve más claro y que éstas se detoxifican.

Además, la hidrólisis provoca la disolución de la casi totalidad de los azúcares.